



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA**  
**CURSO DE ODONTOLOGIA**

**JOANA MARIA DOS SANTOS ALVES**

**VIAS WNT CANÔNICA E NF- $\kappa$ B NA ARTICULAÇÃO**  
**TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS ARTRÍTICOS**

**FORTALEZA**

**2018**

JOANA MARIA DOS SANTOS ALVES

VIAS WNT CANÔNICA E NF- $\kappa$ B NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR  
DE RATOS ARTRÍTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Odontologia do Departamento de  
Clínica Odontológica da Universidade Federal  
do Ceará para a obtenção do Título de Bacharel  
em Odontologia.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Delane Viana Gondim

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A479 Alves, Joana Maria dos Santos.  
VIAS WNT CANÔNICA E NF-κB NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS  
ARTRÍTICOS / Joana Maria dos Santos Alves. – 2018.  
40 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,  
Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Delane Viana Gondim.
1. Artrite Reumatoide. 2. Articulação temporomandibular. 3. Via de sinalização Wnt. 4. NF-kappaB. I.  
Título.

CDD 617.6

---

JOANA MARIA DOS SANTOS ALVES

VIAS WNT CANÔNICA E NF- $\kappa$ B NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR  
DE RATOS ARTRÍTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Odontologia do Departamento de  
Clínica Odontológica da Universidade Federal  
do Ceará para a obtenção do Título de Bacharel  
em Odontologia.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Delane Viana Gondim

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Delane Viana Gondim (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karuza Maria Alves Pereira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha família.

À ciência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Ele que se faz presente em todos os momentos, o meu guia: Deus. A energia que nos dá força para acreditar e correr atrás dos nossos objetivos. Agradeço por cada benção, conquista, desafio e derrotas, pelas portas abertas e as fechadas, pois tudo teve um propósito, e o desfecho foi abençoado.

À minha família por me fazer quem sou e pelo suporte. Agradeço à minha mãe, Ana Cristina, pelos ensinamentos, o apoio incondicional, o cuidado, o carinho e os sacrifícios feitos para que eu alcançasse os meus sonhos. Minha âncora e meu Norte. Obrigada, mãe!

Ao meu pai, José Ivanisleno, pelo esforço hercúleo desempenhado para me proporcionar uma educação de qualidade, muitas vezes colocando-se em segundo plano em prol da família. Meu exemplo de esforço e dedicação.

À minha irmã, Ana Beatriz, pela paciência e ter compartilhado os momentos de desespero e de alegria, sendo a companheira em todos os momentos.

À minha vó, Helena, por se preocupar e se envolver na minha vida estudantil. Agradeço, também, ao meu namorado, Neto, pelo incentivo e a paciência dedicados nessa jornada.

À minha orientadora, Delane Viana Gondim, minha mãe científica, por ter me acolhido e me acompanhado desde o segundo semestre de curso, me lapidando e guiando para a vida acadêmica. Obrigada por acreditar no meu potencial. À Luane Macêdo, pelos ensinamentos, acompanhamento e inspiração desde o início da iniciação científica. Obrigada por tudo.

Aos meus colegas da turma Odontologia UFC 2018.2, com os quais pude compartilhar, durante esses cinco anos, momentos de felicidade, desespero, aprendizado e frustrações, amadurecendo juntos.

À Universidade Federal do Ceará e ao seu corpo docente, por serem referência de ensino nacional e internacional, e fundamentais para a construção da profissional que estou para me tornar.

## **APRESENTAÇÃO**

Este trabalho de conclusão de curso (TCC) está de acordo com o formato alternativo para TCCs, que permite a inserção de artigos científicos de autoria do candidato. Assim, este trabalho é composto de um artigo científico que será submetido ao periódico “Archives of Oral Biology”. As normas do referido periódico encontram-se em anexo.

**“Burdens are for shoulders strong  
enough to carry them.”**

**(Margaret Mitchell)**



## RESUMO

**OBJETIVO:** Investigar a participação das vias Wnt canônica e NF- $\kappa$ B em um modelo experimental de artrite reumatoide (AR) induzida pela albumina sérica bovina metilada (mBSA) na articulação temporomandibular (ATM).

**MATERIAL E MÉTODOS:** Ratos Wistar foram sensibilizados por mBSA + Adjuvante Completo de Freund (CFA) / Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) nos primeiros 14 dias (1x / semana). Posteriormente, receberam 1, 2 ou 3 injeções de mBSA ou solução salina na ATM (1x / semana). A análise do limiar nociceptivo foi realizada durante todo o experimento utilizando um analgesímetro. Após 24 horas de cada injeção de mBSA, as ATMs foram removidas para análise histopatológica e imunoistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, RANKL, Wnt-10b,  $\beta$ -catenina e DKK-1.

**RESULTADOS:** O limiar nociceptivo reduziu após as injeções de mBSA na ATM. Entretanto, somente 24 horas após 2 ou 3 injeções de mBSA, foram observadas alterações morfológicas significativas na articulação, como infiltrado inflamatório na membrana sinovial e no tecido periarticular. Também, a imunomarcagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Wnt-10b,  $\beta$ -catenina foram aumentadas na membrana sinovial em grupos que receberam injeções de reforço de mBSA. Em contrapartida, a imunopressão de DKK-1, RANKL e NF- $\kappa$ B foram estatisticamente significativos apenas no grupo que recebeu 3 injeções de mBSA na ATM.

**CONCLUSÃO:** A imunopressão de Wnt-10b e NF- $\kappa$ B sugerem a participação destas nas alterações morfológicas da ATM durante o processo de desenvolvimento da AR.

**Palavras-chave:** Artrite Reumatoide, Articulação temporomandibular, Via de sinalização Wnt, NF-kappa B

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To investigate the participation of canonical Wnt and NF- $\kappa$ B pathway in an experimental model of rheumatoid arthritis (RA) induced by methylated bovine serum albumin (mBSA) in temporomandibular joint (TMJ).

**DESIGN:** Wistar rats were sensitized by mBSA + Complete Freund Adjuvant (CFA)/Incomplete Freund Adjuvant (IFA) in the first 14 days (1x/week). Subsequently, they received 1, 2 or 3 mBSA or saline solution injections at TMJ (1x/week). Hypernociceptive threshold was performed throughout the experiment using an analgesymeter. After 24 hours of each mBSA injection, the TMJs were removed for histopathological and immunohistochemical analysis for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Wnt-10b,  $\beta$ -catenin, DKK-1, NF- $\kappa$ B and Rank-L.

**RESULTS:** The nociceptive threshold showed higher reduction after mBSA injections in the TMJ. However, only after 24 hours of 2 or 3 mBSA injections, significant morphological alterations in the joint were observed, as chronic inflammatory infiltrate in the synovial membrane and in the periarticular tissue. Immunolabeling of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and Wnt-10b were increased in the synovial membrane in groups that received mBSA booster injections. In contrast, immunoexpression of DKK-1, RANKL and NF- $\kappa$ B were statistically significant only in the group that received 3 injections of mBSA at TMJ.

**CONCLUSION:** The immunoexpression of Wnt-10b and NF- $\kappa$ B suggests their participation in the morphological changes of TMJ during the process of development of RA.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, temporomandibular joint, Wnt signaling pathway, NF-kappa B

**Abbreviations:** Rheumatoid arthritis (RA), Temporomandibular joint (TMJ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), Tumoral Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), National Institute of Health (NIH), phosphate buffered saline (PBS), Complete Freund Adjuvant (CFA), Incomplete Freund Adjuvant (IFA), methylated bovine serum albumin (mBSA), hematoxylin-eosin (HE), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra), receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), Dickkopf-1 (DKK-1), lymphoid enhancer-binding factor-1 (Lef1)

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>17</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>22</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>31</b>
<b>LEGENDAS</b>	<b>36</b>
<b>TABELAS</b>	<b>37</b>
<b>ARQUIVO SUPLEMENTAR</b>	<b>37</b>
<b>DESTAQUES</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>39</b>

**Article type:** Original research

**Title:** Involvement of canonical Wnt and NF- $\kappa$ B pathways in the temporomandibular joint of arthritic rats

**Running title:** Wnt and NF- $\kappa$ B in the TMJ of arthritic rats

**Keywords:** rheumatoid arthritis, temporomandibular joint; canonical Wnt pathway; NF- $\kappa$ B; mBSA

**Authors:** Luane Macêdo de Sousa<sup>a,b</sup>, Joana Maria dos Santos Alves<sup>a</sup>, Rodolfo de Melo Nunes<sup>c</sup>, Conceição da Silva Martins<sup>a</sup>, Gerly Anne de Castro Brito<sup>a</sup>, Karuza Maria Alves Pereira<sup>a</sup>, Paula Goes<sup>a</sup>, Delane Viana Gondim<sup>a</sup>

**Affiliation:**

<sup>a</sup>. Morphofunctional Sciences Post Graduation Program, Department of Morphology, Federal University of Ceará. Rua Delmiro de Farias, S/N CEP 60416-030 Rodolfo Teófilo- Fortaleza, CE, Brazil.<sup>[1]</sup>

<sup>b</sup>. Paulo Picanço School of Dentistry. Rua Joaquim Sá, 900, CEP 60135-218 Dionísio Torres – Fortaleza, CE, Brazil.

<sup>c</sup>. Medical Sciences Post Graduation Program, Department of Clinical Medicine, Federal University of Ceará. Rua Monsenhor Furtado, S/N CEP 60441-750 Rodolfo Teófilo- Fortaleza, CE, Brazil.

luane\_macedo@hotmail.com (Luane Macêdo de Sousa)

joamar18.2@gmail.com (Joana Maria dos Santos Alves)

rodolfo\_k6@yahoo.com.br (Rodolfo de Melo Nunes)

josycristophe@hotmail.com (Conceição da Silva Martins)

gerlybrito@hotmail.com (Gerly Anne de Castro Brito)

karuzaalves@yahoo.com.br (Karuza Maria Alves Pereira)

paulagpinheiro@yahoo.com.br (Paula Goes)

delanegondim@yahoo.com.br (Delane Viana Gondim)

Corresponding Author: Delane Viana Gondim. Morphofunctional Sciences Post  
Graduation Program, Department of Morphology, Federal University of Ceará. Rua  
Delmiro de Farias, S/N CEP 60416-030 Rodolfo Teófilo- Fortaleza, CE, Brazil Phone  
+55 85 33668471; Fax +55 85 33668494

## 1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é um exemplo de doença inflamatória crônica, progressiva e sistêmica caracterizada por inflamação e hiperplasia sinoviais, produção de autoanticorpos e destruição de cartilagem e osso (Cunha et al., 2012; Sodhi et al., 2015). Essa condição afeta aproximadamente 1% da população adulta (Gabriel & Michaud, 2009) e sua etiologia ainda é desconhecida (Miao et al., 2013). A articulação temporomandibular (ATM), uma articulação sinovial, pode ser afetada pela AR. Estima-se que 65% dos pacientes com AR apresentem sintomas na articulação temporomandibular (ATM), e 75% deles tenham envolvimento bilateral (Ruparelia et al., 2014; Ahmed et al., 2015). Os sintomas podem incluir dor facial, edema, movimentos mandibulares limitados devido à restrição da translação condilar, dor de cabeça, trismo, estalos e espasmos musculares (Ruparelia et al., 2014).

Durante a inflamação crônica, a membrana sinovial da ATM é responsável por liberar citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-1, IL-6 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) o líquido sinovial, levando à inflamação, hiperplasia sinovial, degeneração do tecido conjuntivo, fibrose e perfuração do disco articular (Ke et al., 2007).

Modelos experimentais de AR são úteis para replicar muitos aspectos característicos da doença em humanos. A artrite induzida pela albumina de soro bovino metilada (mBSA) reproduz uma inflamação imunomediada com presença de citocinas pró-inflamatórias, hipertrofia celular, angiogênese e destruição de cartilagem e osso (Quinteiro et al., 2012; Quinteiro et al., 2014, Chandrupatla et al., 2015, Bonfante et al., 2018). Um objetivo interessante deste modelo experimental é que ele promove uma monoartrite, assim a articulação contralateral pode ser usada como controle (Elsaid et al., 2007).

A via Wnt regula os processos de homeostase celular como diferenciação celular, proliferação, migração e adesão, e participa de muitas condições patológicas (Imai et al., 2006; Gatica-Andrades et al., 2017; Humphries & Mlodzik, 2017), incluindo a AR (Sen, 2005; Miao et al., 2013). A via canônica Wnt pode promover hiperplasia sinovial e inflamação, formação de panos e erosão óssea e cartilaginosa

durante a progressão da doença (Sen, 2005). Existem pelo menos 3 tipos de vias de sinalização Wnt. Entre eles, a via canônica é a mais estudada e a melhor compreendida até o momento. A ligação de Wnt a seu receptor inibe a glicogênio sintase quinase 3- $\beta$ , liberando  $\beta$ -catenina de seu complexo de destruição, aumentando a presença de  $\beta$ -catenina citoplasmática livre. Esse excesso de  $\beta$ -catenina se transloca para o núcleo e induz uma resposta celular através de transdução gênica (Miao et al., 2013).

A ativação Fator Nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é o fator de transcrição mais crítico em processos inflamatórios e está intimamente envolvida nos distúrbios inflamatórios crônicos, incluindo AR (Liu et al., 2017). O NF- $\kappa$ B tem a capacidade de controlar a expressão de produtos gênicos que afetam várias respostas celulares, incluindo proliferação celular e apoptose (Xia et al., 2018). Essa sinalização pode estimular a neoangiogênese e a inflamação na membrana sinovial (Rigoglou & Papassiviliou, 2013). Na artrite da ATM humana, a ativação do NF- $\kappa$ B em fibroblastos sinoviais está associada à expressão da COX-2 induzida pelo TNF- $\alpha$ , contribuindo para sensibilização nociceptiva e resposta inflamatória (Ke et al, 2007).

Portanto, considerando o papel da resposta do hospedeiro na destruição da ATM durante a AR, estudos experimentais são essenciais para compreender os mecanismos patológicos subjacentes à lesão tecidual e ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Para tanto, nosso grupo investigou as alterações morfológicas da articulação, bem como a participação das vias canônica Wnt e NF- $\kappa$ B na progressão da doença.

## **1. MATERIAIS E MÉTODOS**

### *2.2. Aspectos Éticos*

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional para uso animal (N° 35/15) e realizado de acordo com as diretrizes do *National Institute of Health* (NIH) dos EUA, respeitando o uso e cuidado dos animais para procedimentos experimentais. Todos os ratos foram alojados em uma sala mantida a uma temperatura ambiente constante (22-24 ° C) com um ciclo claro / escuro de 12 horas e fácil acesso a comida e água.

### *2.3. Indução da AR na ATM e grupos experimentais*

Vinte e quatro ratos Wistar machos (200-250 g) foram divididos em 4 grupos (n = 6): controle, mBSA (1), mBSA (2) e mBSA (3). Inicialmente, os animais que receberam mBSA (10µl / ATM esquerda) foram sensibilizados com 500 µg de mBSA em 200 µL de uma emulsão contendo 100 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 100 µL de adjuvante completo de Freund (CFA), administrados em região subcutânea. Injeções de reforço de mBSA dissolvidas em adjuvante incompleto de Freund (IFA) foram administradas 7 e 14 dias após a primeira imunização (Lora et al., 2017). 21 dias após a primeira injeção, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com quetamina a 2% (80 mg / kg) e xilazina a 10% (10 mg / kg) e artrite na ATM esquerda foi induzida nos animais imunizados através injeções intra-articulares de mBSA (10 µg / articulação) dissolvido em 10 µL de PBS. Injeções de reforço de mBSA foram dadas nos dias 28 e 35 (Lora et al., 2017). Os animais foram eutanasiados 24 h após cada injeção de mBSA na ATM esquerda. O grupo controle não recebeu injeções intra-articulares de mBSA. Os animais que receberam injeções de 1, 2 ou 3 mBSA na ATM esquerda receberam solução salina (0,9%; 10 µl; i.art) na ATM direita. (Arquivo suplementar).

### *2.4. Hiperalgisia Mecânica*

A hiperalgisia mecânica na ATM foi avaliada utilizando um analgésico digital (Electronic von Frey Digital, Insight Instruments, São Paulo, SP, Brasil) para medir o limiar nociceptivo (em gramas) ao se aplicar o transdutor na região da ATM. Esta medida foi estimada avaliando o limiar de intensidade de força aplicado à região da ATM necessário para uma resposta reflexa (por exemplo, retirada da cabeça). As medidas foram realizadas por examinador calibrado, sem conhecimento dos tratamentos (Gondim et al., 2012).

Os animais foram submetidos a sessões de condicionamento às mensurações de limiar de retirada da cabeça na sala de testes por 5 dias consecutivos sob temperatura controlada e iluminação reduzida. Os testes de hiperalgisia mecânica foram realizados nos dias 0, 1, 3, 6, 7, 11, 13, 14, 18 e 20 após a indução subcutânea de mBSA e



Adjuvante de Freund e nos dias 21 (6h após à primeira injeção intra-articular de mBSA), 24, 28, 31 e 35.

### 2.5. Análise Histopatológica

Após as eutanásias, a ATM e os tecidos periarticulares foram removidos. Os tecidos foram fixados em formol tamponado 10% por 24 h, desmineralizados em EDTA 10%, embebidos em parafina e seccionados ao longo do longo eixo da ATM. Secções (4 µm) abrangendo cômulo, disco articular, membrana sinovial, cartilagem articular e tecido periarticular foram avaliadas sob microscopia de luz (Leica DM 2000, Wetzlar, Alemanha). Os espécimes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e as secções foram avaliadas por um patologista experiente. As pontuações foram dadas semi-quantitativamente para os parâmetros avaliados: infiltrado inflamatório da membrana sinovial e espessamento da membrana sinovial. As secções foram classificadas em uma escala de 0 a 3 para infiltrado inflamatório, onde: 0 = sem infiltrado; 1 = infiltrado sinovial discreto; 2 = infiltrado sinovial moderado; 3 = infiltrado sinovial intenso. Para espessamento da membrana sinovial, foi utilizada uma escala de 0 a 3, onde: 0 = sem espessamento; 1 = espessamento discreto da membrana sinovial; 2 = espessamento moderado; 3 = espessamento intenso da membrana sinovial. (Chaves et al., 2011).

### 2.6. Análise Imunoistoquímica para *TNF-α*, *IL-1β*, *RANKL*, *Wnt-10b*, *DKK1* *β*-catenina e *NF-κB*

A imunohistoquímica para *TNF-α*, *IL-1β*, *NF-κB*, *RANKL*, *Wnt-10b*, *DKK1* e *β*-catenina foi realizada nos grupos mBSA (2) e mBSA (3), utilizando o método da estreptavidina-biotinaperoxidase em secções de tecido fixado em formol tamponado embebidas em parafina (4 mm de espessura) montadas em lâminas de microscópio revestidas com poli-L-lisina. A ATM direita de mBSA salina (2) e mBSA salina (3) foram utilizadas como controle. Após a desparafinização, a recuperação antigênica foi realizada com solução de recuperação com tampão citrato (pH 6,0) por 20 min em 95 ° C. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 min para reduzir a ligação não específica. As secções foram então incubadas com anti-*IL-1β* (diluição 1: 100; Abcam; Cambridge, UK), anti-*TNF-α* (diluição 1: 100; Abcam; Cambridge, UK), anti-*RANKL* (diluição 1: 100; Santacruz Biotechnology; Califórnia, EUA), anti-Cat-Catenina (diluição 1: 200; DAKO; Califórnia, EUA), anti-*NF κ B* P50 (diluição 1: 400;

Santa Cruz Biotechnology; Califórnia, EUA), anti-DKK-1 (diluição 1 : 100; Santacruz Biotechnology, Califórnia, EUA), anti-Wnt-10b (diluição 1: 400; Abcam; Cambridge, UK) diluído em diluente de anticorpo DAKO durante 1 h. Os locais de ligação dos anticorpos foram visualizados pela incubação com solução de diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB, DAKO; Califórnia, EUA). Um controle negativo sem o anticorpo primário foi realizado em paralelo com a incubação. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina, desidratadas em álcool a diferentes concentrações, clareadas em xileno e cobertas com lamínulas. A positividade para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, RANKL, Wnt-10b, DKK1 ou  $\beta$ -catenina foi determinada por coloração marrom no nível do citoplasma na membrana sinovial. As seções foram avaliadas por um examinador desconhecido do estudo. A quantificação de células imunocoradas citoplasmáticas da membrana sinovial foi realizada em cinco campos selecionados aleatoriamente (400X) sob um microscópio (Leica DM 2000, Wetzlar, Alemanha) e o valor médio percentual foi usado como valor para essas seções (Liu et al., 2014).

### *2.7. Análise estatística*

Os dados são apresentados como médias  $\pm$  DPM ou medianas com a faixa de variação (máxima e mínima) quando apropriado para 6 animais por grupo. Foram utilizados One-way ANOVA ou two-way ANOVA, ambos seguidos pelo pós-teste de Tukey. Todos os testes foram bilaterais e considerados estatisticamente significativos se o nível de probabilidade (valor de p)  $\leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com os softwares GraphPad Prism 6 (software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EUA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

## **3. RESULTADOS**

### *3.3. Análise da hiperalgesia mecânica da AR induzida por mBSA*

Diferenças significativas não foram observadas durante a fase de sensibilização, sugerindo que a administração subcutânea de mBSA não modificou o limiar nociceptivo na ATM (fig. 1A). No dia 21, seis horas após a primeira injeção intra-articular de mBSA, uma nova medição foi registrada e uma redução significativa do limiar nociceptivo foi observada (p <0,0001). No dia 28, 6h após a segunda injeção

de mBSA, observou-se redução significativa do limiar nociceptivo quando comparado aos dias 21 e 24 ( $p < 0,05$ ). Três dias após a segunda indução (dia 31), esse limiar permaneceu menor quando comparado aos dias 20 e 21 ( $p < 0,05$ ). Na terceira administração de reforço de mBSA na ATM esquerda, no dia 35, o limiar nociceptivo permaneceu reduzido e foi estatisticamente significativo comparado aos dias 20 e 21 ( $p < 0,05$ ) (fig. 1B). A solução salina foi administrada na ATM direita de ratos que receberam 1, 2 ou 3 injeções de mBSA na ATM esquerda e nenhuma diferença estatística foi observada quando comparada ao grupo controle (dados não mostrados).

### 3.4. Análise histopatológica da ATM

Nenhuma alteração foi observada nos tecidos articulares do grupo controle (fig. 2A), bem como na ATM direita dos animais que receberam injeções salinas (2B, C e D). Por outro lado, o grupo de mBSA (1) apresentou discreto infiltrado inflamatório na membrana sinovial (Fig. 2E). O grupo de mBSA (2) (Fig. 2F), no entanto, mostrou intenso infiltrado inflamatório mononuclear. Além disso, o grupo mBSA (3) (Fig. 2G) apresentou intenso infiltrado mononuclear, espessamento da membrana sinovial e formação de *pannus*.

Após análise histopatológica, os escores foram aplicados nos grupos experimentais para infiltrado inflamatório e espessamento da membrana sinovial. O grupo de mBSA (3) foi descrito pelo patologista e mostrou maior infiltração, espessamento discal e destruição articular. Os tipos celulares observados nesse grupo foram predominantemente macrófagos, linfócitos e plasmócitos, características da inflamação crônica. Além disso, o grupo mBSA (2) apresentou escores expressivos para o infiltrado inflamatório, mas não houve diferença estatística. Os grupos salina e mBSA (1) não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (Tabela 1).

### 3.5. Ensaio imunistoquímico para *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *NF- $\kappa$ B*, *RANKL*, *Wnt-10b*, *$\beta$ -catenina* e *DKK-1*

Análise imunistoquímica para *TNF- $\alpha$*  (3C e 3D) e *IL-1 $\beta$*  (3G e 3H) mostrou aumento na imunexpressão dessas citocinas, o que foi caracterizado como células com coloração marrom nas ATMs que receberam injeções intra-articulares de mBSA comparadas com as articulações contra-laterais (3A, 3B, 3E and 3F). Nenhuma

imunomarcção de ambos os anticorpos foi evidente nas lâminas utilizadas como controle negativo, nas quais o anticorpo primário foi substituído pelo anticorpo diluente (Dako, St. Louis, USA).

Houve um aumento da imunomarcção de TNF- $\alpha$  na membrana sinovial dos grupos de animais que receberam injeções de reforço de mBSA. Os grupos mBSA (2) e mBSA (3) mostraram imunomarcção maior de TNF- $\alpha$  quando comparada com os grupos salina ( $p < 0,05$ ). O grupo mBSA (3) mostrou maior imunomarcção de TNF- $\alpha$  quando comparada com o grupo mBSA (2) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5A).

Os grupos mBSA (2) e mBSA (3) mostraram maior imunomarcção para IL-1 $\beta$  na membrana sinovial quando comparado aos grupos salina ( $p < 0,05$ ). O grupo mBSA (3) mostrou maior imunomarcção para IL-1 $\beta$  em relação ao grupo mBSA (2) (Fig. 5B).

Nossos resultados também mostraram um aumento na expressão de Wnt-10b (Fig. 4C e 4D), DKK-1 (Fig. 4L) e NF $\kappa$ B (Fig. 3L) na ATM de ratos artríticos. Nos grupos mBSA (2) e mBSA (3), a expressão de Wnt-10b em membrana sinovial foi significativamente maior comparada aos grupos salina ( $p < 0,05$ ). O grupo mBSA (2) mostrou um maior aumento na imunomarcção de Wnt-10b que mBSA (3) (Fig. 5E). Não houve diferença estatisticamente significativa na imunomarcção de  $\beta$ -catenina entre os grupos (Fig. 5F). Não houve diferença estatística na imunexpressão de NF- $\kappa$ B (Fig 5C), RANKL (Fig 5D) e DKK1 (Fig 5G) em mBSA (3) group (Fig. 5).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que a fase de sensibilização com injeções de CFA ou IFA e mBSA em diferentes locais no dorso do rato não alterou o limiar de retirada da cabeça. O limiar nociceptivo foi reduzido após 6h da primeira injeção intra-articular de mBSA na ATM esquerda. De acordo com estudos anteriores, 1 injeção de mBSA foi capaz de reduzir o limiar nociceptivo, tanto no joelho de ratos (Oliveira et al., 2016) quanto na articulação tibiofemoral de camundongos (Farinon et al, 2013). Quinteiro et al (2014) relataram que 24 h após a primeira injeção mBSA na ATM de ratos, os animais mostraram um comportamento doloroso e um importante influxo inflamatório.

Após 24h de injeção de mBSA na ATM de ratos, observou-se redução do limiar nociceptivo e discreto infiltrado inflamatório agudo, marcado por neutrófilos. Desta forma, injeções de reforço de mBSA foram utilizadas na ATM (Lora et al., 2017), a fim de verificar o desenvolvimento da AR e isso foi capaz de reproduzir os mesmos achados da AR em humanos. Assim, observou-se no presente estudo que o grupo de mBSA (3) apresentava um infiltrado inflamatório crônico, com macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de redução dos espaços supra e infra-disco e destruição da cartilagem articular (dados não mostrados).

Um achado interessante deste modelo experimental é que ele promove uma monoartrite, assim a articulação contralateral pode ser usada como controle (Elsaid et al., 2007). Confirmamos este fato em animais artríticos que receberam injeção de solução salina na ATM direita, a qual não mostrou hiperalgesia ao estímulo mecânico ou presença de infiltrado inflamatório.

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  estão presentes na inflamação da membrana sinovial e, considerando o envolvimento de citocinas na patogênese da AR, novas abordagens terapêuticas envolvendo tais mediadores têm sido usadas no tratamento dessa doença (Westacott et al., 1990; Farahat et al., 1993; Towle et al. al., 1997). A administração do inibidor do receptor do TNF- $\alpha$  é uma abordagem terapêutica bem estabelecida para AR em outras articulações. O uso do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) para o tratamento da artrite reumatóide foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) (Raychaudhuri & Raychaudhuri., 2009). Um aumento na expressão de IL-1 $\beta$  na membrana sinovial foi observado na área de *pannus* dos animais que receberam 2 e 3 injeções de mBSA. Células mononucleares provenientes do *pannus* inflamatório produzem espontaneamente IL-1 $\beta$  (Wooley et al., 1993) e esta citocina desempenha um papel importante no recrutamento de células inflamatórias para a articulação (Towle et al., 1997).

O TNF- $\alpha$  contribui diretamente para a inflamação sinovial e a degradação tecidual. Na AR, níveis elevados de TNF- $\alpha$  foram encontrados nas articulações afetadas, com o conseqüente aumento da expressão de moléculas de adesão, produção de quimiocinas, angiogênese e ativação de nociceptores (McInnes et al., 2016). Além disso, o TNF- $\alpha$  induz a osteoclastogênese e contribui para a inibição da diferenciação

dos osteoblastos (Bertolini et al., 1986). Em nosso estudo, a expressão de TNF- $\alpha$  foi significativamente maior na membrana sinovial e mostrou ser estatisticamente significativa nos grupos mBSA (2) e mBSA (3), podendo estar correlacionada aos achados inflamatórios na membrana sinovial.

Estudos demonstraram que a ativação do NF- $\kappa$ B promove a hiperplasia sinovial estimulando a proliferação e inibindo a apoptose de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (Liu et al., 2017; Xia et al., 2018). A via NF- $\kappa$ B resulta na síntese de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 e RANKL causando sinovite acompanhada de alterações morfológicas da membrana sinovial, como infiltrado de células mononucleares, edema e rigidez articular (Rigoglou & Papavassiliou, 2013). Embora ambos os grupos induzidos por AR apresentem expressão aumentada de TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , apenas o grupo mBSA (3) apresentou alta expressão de NF- $\kappa$ B na membrana sinovial. Lawrence (2009) mostrou que a ativação da via do NF- $\kappa$ B deve-se ao aumento da expressão dessas citocinas, levando à transcrição de genes alvo de mediadores pró-inflamatórios. Esses fatores podem aumentar a resposta inflamatória, a hiperplasia sinovial e a destruição articular.

Embora os autores relacionem a expressão do RANKL com maior frequência a osteócitos e osteoblastos, ele também está presente nas células sinoviais, células T ativadas, células B e células *natural killer* (Boman et al., 2017). O grupo mBSA (3) mostrou aumento da imunexpressão de RANKL em membrana sinovial e isso pode estar relacionado à possível ativação do NF- $\kappa$ B.

As proteínas Wnt desempenham um papel central em uma variedade de processos de desenvolvimento e eventos que incluem organogênese, morfogênese, diferenciação celular e remodelação tecidual (Rabelo et al., 2010) e são expressamente ativados em tecidos sinoviais de pacientes com AR (Imai et al., 2006; Xiao et al., 2011). Nossos dados mostraram uma imunomarcção aumentada para Wnt-10b na membrana sinovial, o que sugere uma ativação específica da via Wnt na sinovial da ATM de ratos artríticos. Estudos mostraram a presença de agregados celulares inflamatórios na camada de sinoviócitos, os quais estiveram envolvidas na patogênese da AR (Choy & Panayi, 2001; Firestein, 2003). Em pacientes com AR, foram observados a expressão de Wnt-10b e  $\beta$ -catenina em fibroblastos e em células de revestimento endotelial e sinovial

(Imai et al., 2006). Essa expressão poderia levar a um aumento na produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz, levando à inflamação, hiperplasia sinovial e erosão da cartilagem (Sen et al., 2000; Imai et al., 2006; van der Bosh et al., 2015; van der Bosh et al., 2017).

A família Dickkopf (DKK) é um inibidor endógeno da via Wnt que bloqueia a sinalização por ligação a proteína relacionada com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) (Malysheva et al., 2016). Estudos mostraram que a DKK-1 é secretada pela membrana sinovial em resposta à inflamação e sua imunoexpressão é inversamente correlacionada ao grau de severidade radiográfica de articulações artríticas (Honsawek et al., 2010; Miao et al., 2013). Nossos resultados mostraram um aumento da marcação positiva para DKK-1 no grupo mBSA (3). Isso pode estar relacionado à diminuição da expressão de Wnt-10b no grupo mBSA (3), como um *feedback* negativo para a síntese de Wnt-10b. Estudos mostraram que a sinalização Wnt canônica leva à produção de DKK-1 como um *feedback* negativo através da ativação do complexo de transcrição  $\beta$ -catenina / TCF (Chamorro et al., 2005; Niida et al., 2004). A DKK-1 está envolvida no processo de remodelação do osso articular e na reparação de doenças reumáticas sistêmicas humanas, como AR (Miao et al., 2013). Esses resultados podem indicar um possível mecanismo de reparo articular na ATM. A interação entre os mediadores da via de sinalização Wnt canônica deve ser investigada.

A via de sinalização Wnt pode regular alguns genes-alvo do NF- $\kappa$ B e regulações cruzadas positivas e negativas foram observadas (Ma et al., 2015; Ma & Hottiger, 2016). Outra possível relação é que a ativação do NF- $\kappa$ B poderia inibir a translocação nuclear da  $\beta$ -catenina ao interferir na formação do complexo transcricional  $\beta$ -catenina / TCF (Ma & Holtiger, 2016). Os componentes da via de sinalização Wnt canônica também podem modular a resposta imune e inflamatória pela interação com NF- $\kappa$ B (Nejak et al., 2013; Ma & Holtiger, 2016), e a ativação de ambas as vias em condrócitos poderia regular positivamente o fator ativador de linfócitos-1 (Lef1) pela formação de um complexo gerando destruição da cartilagem (Yun et al., 2007).

Nossos resultados sugerem a participação das vias Wnt canônica e NF- $\kappa$ B na ATM de ratos com artrite. A maior expressão de DKK-1 no grupo mBSA (3) pode ser

resultado de um *feedback* negativo na sinalização Wnt canônica. A investigação dessas interações deve ser estudadas futuramente.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a assistência técnica de Howard Lopes Ribeiro Júnior, Flávia de Araújo Silva e Maria do Socorro França Monte. Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesse com relação à autoria e / ou publicação deste artigo.

## REFERÊNCIAS

1. Aceves-Avila, F. J., Chávez-López, M., Chavira-González, J. R., Ramos-Remus C. (2013). Temporomandibular joint dysfunction in various rheumatic diseases. *Reumatismo*, 65, 126-130. <https://doi.org/10.4081/reumatismo.2013.126>.
2. Ahmed, N., Catrina, A. I., Alyamani, A. O., Mustafa, H., Alstergren, P. (2015). Deficient cytokine control modulates temporomandibular joint pain in rheumatoid arthritis. *European Journal of Oral Sciences*, 123, 235-241. <https://doi.org/10.1111/eos.12193>.
3. Bertolini, D. R., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Smith, D. D., Mundy, G. R. (1986). Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*, 319, 516-518. <https://doi.org/10.1038/319516a0>.
4. Boman, A., Kokkonen, H., Arlestig, L., Berglin, E., Rantapää-Dahlqvist, S. (2017). Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) but not sclerotin or gene polymorphisms is related to joint destruction in early rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 36, 1005-1012. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3570-4>.
5. Bonfante, R., Napimoga, M. H., Macedo, C. G., Abdalia, H. B., Pieroni, V., Clemente-Napimoga, J. T. (2018). The P2X7 receptor, cathepsin S and fractalkine in the trigeminal subnucleus caudalis signal persistent hypernociception in temporomandibular rat joints. *Neuroscience*, 1 (391), 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.09.005>



6. Caplazi, P., Baca, M., Barck, K., Carano, R. A. D., DeVoss, J., Lee, W. P., Bolon, B., Diehl, L. (2015). Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. *Veterinary Pathology*, 52 (5), 819-826. <https://doi.org/10.1177/0300985815588612>
7. Chamorro, M. N., Schawartz, D. R., Vonica, A., Brivanlou, A. H., Cho, K. R., Varmus, H. E. (2005). FGF-20 and DKK-1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *The EMBO Journal*, 24 (1), 73-84. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600460>
8. Chandrakesan, P., Jakkula, L. U., Ahmed, I., Roy, B., Anant, S., Umar, S. (2013) Differential effects of  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B interplay in the regulation of cell proliferation, inflammation and tumorigenesis in response to bacterial infection. *PloS One*, 8, e79432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079432>.
9. Chadrupatla, D. M. S. H., Weijers, K., Gent, Y. Y. J., de Greeuw, I., Lammertsma, A. A., jansen, G., van der Laken, C. J., Molthofl, C. F. M. (2015). Sustained Macrophage Infiltration upon Multiple Intra-Articular Injections: Na Improved Rat Model of Rheumatoid Arthritis for PET Guided Therapy Evaluation. *BioMed Research International*, 2015:509295. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/509295>.
10. Chaves, H. V., Ribeiro, R. A., De Souza, A. M. B., Silva, A. A. R., Gomes, A. S., Vale, M. L., ... Brito, G. A. C. (2011). Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 2011:707985. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/707985>.
11. Choy, E. H., Panayi, G. S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine*, 344, 907-916. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103223441207>.
12. Cunha, C. O., Pinto, L. M. S., Mendonça, L. M., Saldanha, A. D. D., Conti, A. C. C. F., Conti, P. C. R. (2012). Bilateral asymptomatic fibrous-ankylosis of the temporomandibular joint associated with rheumatoid arthritis: a case report. *Brazilian Dental Journal*, 23, 779-782. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402012000600025>.
13. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, 388,548-554. <https://doi.org/10.1038/41493>.

14. Dijkgraaf, L. C., de Bont, L. G. M., Boering, G., Liem, R. S. B. (1996). Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint. *Jornal of Oral Maxillofacial Surgery*, 54, 332-338. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(96\)90755-7](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(96)90755-7).
15. Elsaid, K.A., Jay, G.D., Chichester, C.O. (2007). Reduced Expression and Proteolytic Susceptibility of Lubricin/Superficial Zone Protein May Explain Early Elevation in the Coefficient of Friction in the Joints of Rats with Antigen-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 56, 108-116. <https://doi.org/10.1002/art.22321>.
16. Farahat, M. N., Yanni, G., Poston, R., Panayi, G. S. (1993). Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Disease*, 52, 870-875. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.52.12.870>.
17. Farinon, M., Lora, P. S., Francescato, L. N., Bassani, V. L., Henriques, A.T., Xavier, R. M., De Oliveira, P. G. (2013). Effect of Aqueous Extract of Giant Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) in Antigen-Induced Arthritis. *The Open Rheumatology Journal*, 7, 129-133. <https://doi.org/10.2174/1874312901307010129>.
18. Firestein, G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423, 356-361. <https://doi.org/10.1038/nature01661>.
19. Gabriel, S. E., Michaud, K. (2009). Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 11, 229. <https://doi.org/10.1186/ar2669>
20. Gatica-Andrades, M., Vagenas, D., Kling, J., Nguyen, T. T. K., Benham, H., Thomas, R., ... Blumenthal, A. (2017). WNT ligands contribute to the immune response during septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice. *Blood Advances*, 1, 1274-1286. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017006163>.
21. Gondim, D. V., Costa, J. L., Rocha, S. S., Brito, G. A., Ribeiro, R. A., Vale, M. L. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 90, 395-405. <https://doi.org/10.1139/Y2012-003>.

22. Honsawek, S., Tanavelee, A., Yuktanandana, P., Ngarmukos, S., Saetan, N., Tantavisut, S. (2010). Dickkopf-1 (DKK-1) in plasma and synovial fluid is inversely correlated with radiographic severity of knee osteoarthritis patients. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11, 257. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-257>.
23. Humphries, A.C., Mlodzik, M. (2017). From instruction to output: Wnt/PCP signalling in development and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 51,110-116. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.12.005>.
24. Imai, K., Morikawa, M., D'Armiento, J., Matsumoto, H., Komiya, K., Okada, Y. (2006). Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 1615-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.075>.
25. Ke, J., Long, X., Liu, Y., Zhang, Y, F., Li, J., Fang, W., Meng, Q. G. (2007). Role of NF- $\kappa$ B, in TNF- $\alpha$  induced COX-2 Expression in synovial fibroblasts from human TMJ. *Journal of Dental Research*, 86 (4), 363-367. <https://doi.org/10.1177/154405910708600412>.
26. Lawrence, T. (2009). The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1 (6), a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.
27. Lemos, G. A., Silva, P. L. P., Batista, A. U. D., Palomari, E. T. (2018). Experimental Model of temporomandibular joint arthritis: evaluation of contralateral joint and masticatory muscles. *Archives of Oral Biology*, 95, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.003>.
28. Liu, Y. D., Liao, L. F., Zhang, H. Y., Lu, L., Jiao, K., Zhang, M., Wang, M. Q. (2014). Reducing dietary loading decreases mouse temporomandibular joint degradation induced by anterior crossbite prosthesis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, 302-312. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.11.014>.
29. Liu, Y. R., Yan, X., Yu, H. X., Yao, Y., Wang, J. Q., Li, X. F., ... Li, J. (2017). NLRC5 promotes cell proliferation via regulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway in Rheumatoid arthritis. *Molecular Immunology*, 91,24-34. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.08.024>.

30. Lora, V. R. M. M., Clemente-Napimoga, J. T., Abdalla, H. B., Macedo, C. G., Canales, G. T., Barbosa, C. M. R. (2017). Botulinum toxin type A reduces inflammatory hypernociception induced by arthritis in the temporomandibular joint of rats. *Toxicon*, 129, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.010>.
31. Ma, B., Fey, M., Hottiger, M. O. (2015). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits CBP-mediated RelA acetylation and expression. Of proinflammatory NF- $\kappa$ B target genes. *Journal of Cell Science*, 128, 2430-2436. <https://doi.org/10.1242/jcs.168542>.
32. Ma, B., Hottiger, M. O. (2016). Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -Catenin and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway during Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 7, 378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00378>.
33. Malysheva, K., Rooji, K., Lowik, C. W. G. M., Baten, D. L., Rose-John, S., Stoika, R., Korchynskyi, O.. (2016). Interleukin6/Wnt interactions in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblast. *Croatian Medical Journal*, 57 (2), 89-98. <https://doi.org/10.3325/cmj.2016.57.89>.
34. McInnes, I. B., Buckley, C. D., Isaacs, J. D. (2016). Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. *Nature Reviews Rheumatology*, 12, 63-68. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.171>.
35. Miao, C. G., Yang, Y. Y., He, X., Li, X. F., Huang, C., Huang, Y., ... Li, J. (2013). Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signalling*, 25, 2069-2078. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.00>.
36. Moraes, L. O. C., Tedesco, R. C., Arraéz-Aybar, L. A., Klein, O., Mérida-Velasco, J. R., Alonso, L. G. (2015). Development of synovial membrane in the temporomandibular joint of the human fetus. *European Journal of Histochemistry*, 59 (4), 2569. <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2569>.
37. Nejak-Bowen, K., Kikuchi, A., Monga, S. P. (2013). Beta-catenin-NF- $\kappa$ B interactions in murine hepatocytes: a complex to die for. *Hepatology*, 57, 763-774. <https://doi.org/10.1002/hep.26042>.
38. Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Akiyama, T. (2004). DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of

- beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*, 23 (52), 8520-8526. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207892>
39. Nozawa-Inoue, K., Amikuza, N., Ikeda, N., Suzuki, A., Kawano, Y., Maeda, T. (2003). Synovial membrane in the temporomandibular joint- Its morphology, function and development. *Archives of Histology and Cytology*, 66 (4), 289-306. <https://doi.org/10.1679/aohc.66.289>.
40. Oliveira, M. C., Tavares, L. P., Vago, J. P., Batista, N.T., Queiroz-Junior, C. M., Vieira A.T., Ferreira, A. V. M. (2016). Tumor Necrosis Factor, but not neutrophils, alters the metabolic profile in acute experimental arthritis. *Plos One*, 11, e0146403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146403>.
41. Quinteiro, M. S., Napimoga, M. H., Mesquita, K. P., Clemente-Napimoga, J. T. (2012) The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ<sub>2</sub> on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. *European Journal of Pain*, 16 (8), 1106-1115. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2012.00114.x>
42. Quinteiro, M.S., Napimoga, M. H., Macedo, C. G., Freitas, F. F., Abdalla, H. B. Bonfante, R., Trindade-Clemente Napimoga, J. (2014). 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. *European Journal of Pharmacology*, 740, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.002>.
43. Rabelo, F. S., da Mota, L. M., Lima, R. A., Lima, F. A., Barra, G. B., de Carvalho, J. F., Amato, A. A. (2010). The Wnt signaling pathway and rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 2019, 207-210. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.08.003>.
44. Raychaudhuri, S. P., Raychaudhuri, S. K. (2009). Biologics: target-specific treatment of systemic and cutaneous autoimmune diseases. *Indian Journal of Dermatology*, 54, 100-109. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.53175>.
45. Rigoglou, S., Papavassiliou, A. G. (2013). The NF- $\kappa$ B signaling pathway in osteoarthritis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45, 2580-2584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.018>.
46. Ruparelia, P. B., Shah, D. S., Ruparelia, K., Sutaria, S. P., Pathak, D. (2014). Bilateral TMJ involvement in rheumatoid arthritis. *Case Reports in Dentistry*, 2014:262430. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/262430>.

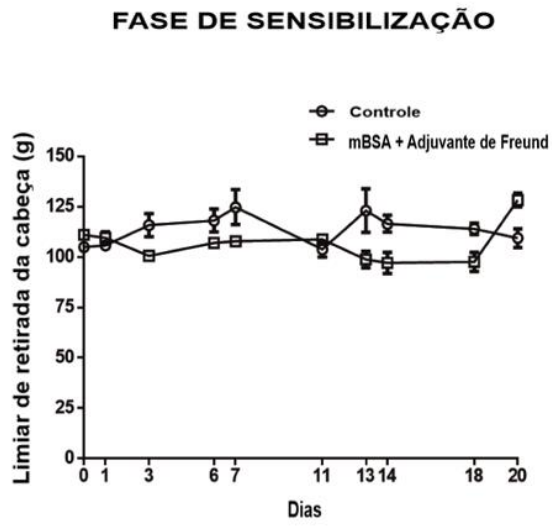
47. Sen, M. (2005). Wnt signaling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 44, 708-713. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh553>.
48. Sodhi, A., Naik, S., Pai, A., Anuradha, A. (2015). Rheumatoid arthritis affecting temporomandibular joint. *Contemporary Clinical Dentistry*, 6, 124-127. <http://doi.org/10.4103/0976-237X.149308>.
49. Towle, C. E., Hung, H.H., Bonassar, L. J, Treadwell, B. V. (1997). Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 5, 293-300. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(97\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(97)80008-8).
50. Van der Bosh, M. H., Blom, A. B., Sloetjes, A. W., Koenders, M. I., van de Loo, F. A., van den Berg, W. B., van Lent, P. L., van der Kraam, P. M. (2015). Induction of canonical Wnt signaling by synovial overexpression of selected Wnts leads to protease activity and early osteoarthritis-like cartilage damage. *The American Journal of Pathology*, 185 (7), 1970-1980. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.013>.
51. Van der Bosh, M. H., Blom, A. B., van de Loo, F. A., Koenders, M. I., Lafeber, F. P., van den Berg, W. B., van der Kraam, P. M., van Lent, P. L. (2017). Synovial Wnt signaling induces the expression. Of MMPs and is associated with disease progression in early symptomatic osteoarthritis patients. *Arthritis & Rheumatology*, 69 (10), 1978-1983. <https://doi.org/10.1002/art.40206>.
52. Wadhwa, S., Kapila, S. TMJ Disorders: Future innovations in diagnostics and therapeutics. (2008). *Journal of Dental Education*, 72 (8), 930-947.
53. Westacott, C.I., Witcher, J.T., Barnes, I.C., Thompson, D., Swan, A.J., Dieppe, P.A. (1990). Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Disease*, 49, 676-681. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.49.9.676>.
54. Witulski, S., Vogl, T.J., Rehart, S., Ottl, P. (2014). Evaluation of the TMJ by means of Clinical TMD Examination and MRI Diagnostics in Patients with Rheumatoid Arthritis. *BioMed. Research International*, 2014:328560. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/328560>.
55. Wooley, P.H., Whalen, J.D., Chapman, D.L., Berger, A.E., Richard, K.A., Aspar, D.G., Staite, N.D. (1993). The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced

- arthritis in mice. *Arthritis & Rheumatology*, 36, 1305-1314. <https://doi.org/10.1002/art.1780360915>.
56. Xiao, C. Y., Pan, Y. F., Guo, X. H., Wu, Y. Q., Gu, J. R., Cai, D. Z. (2011). Expression of  $\beta$ -catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 40, 26-33. <https://doi.org/10.3109/03009742.2010.486767>.
57. Xia, Z. B., Meng, F. R., Fang, Y. X., Wu, X., Zhang, C. W., Liu, Y., Liu, D., Li, G. Q., Feng, F. B., Qiu, H. Y. (2018) Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway induces apoptosis and suppresses proliferation and angiogenesis of human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis. *Medicine*, 97, 23. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000010920>.
58. Yun, K., Choi, Y. D., Nam, J. H., Park, Z., Im, S. H. (2007). NF-kappaB regulates Lef1 gene expression in chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357, 589-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.170>.

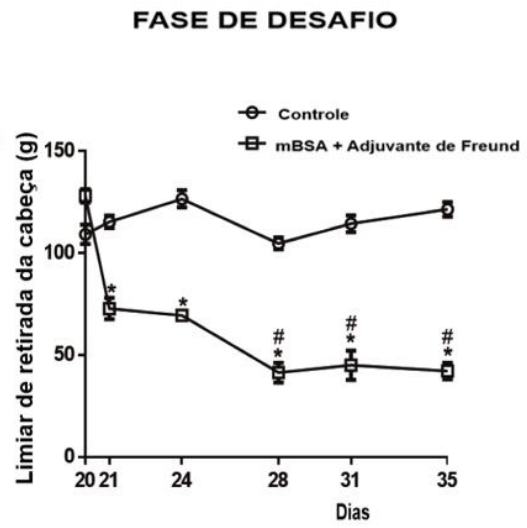
## FIGURAS

Fig. 1.

A

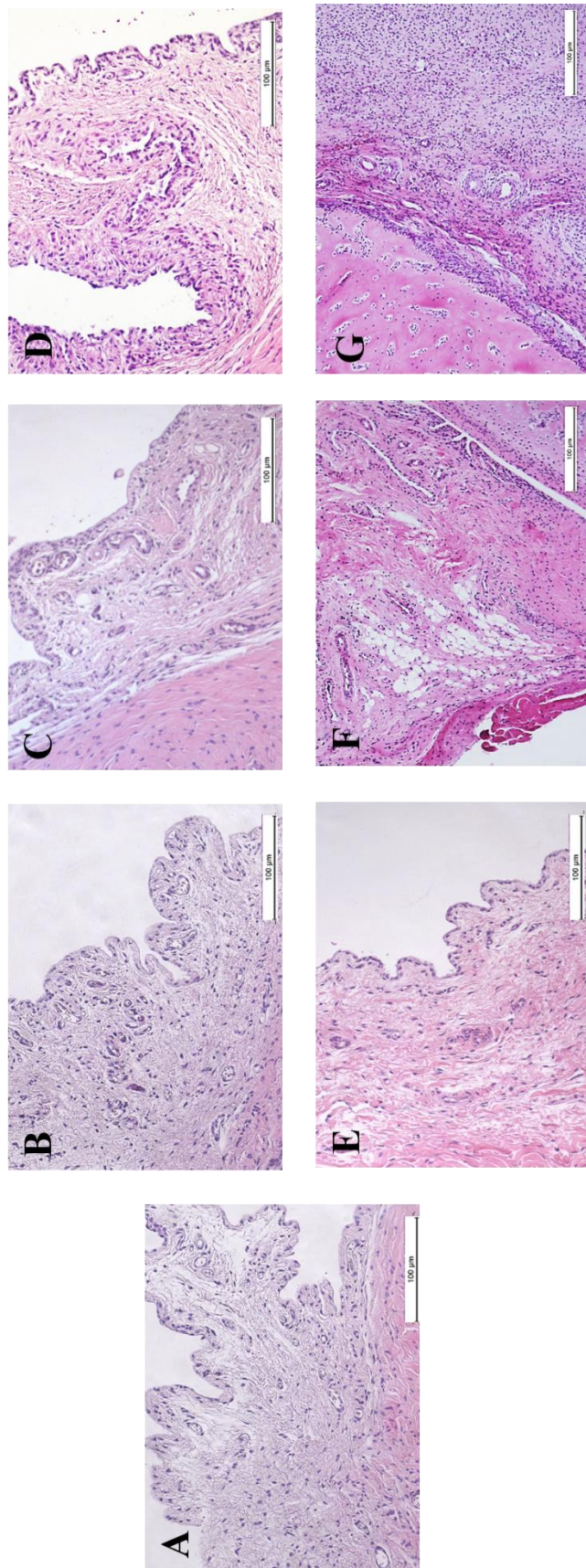


B

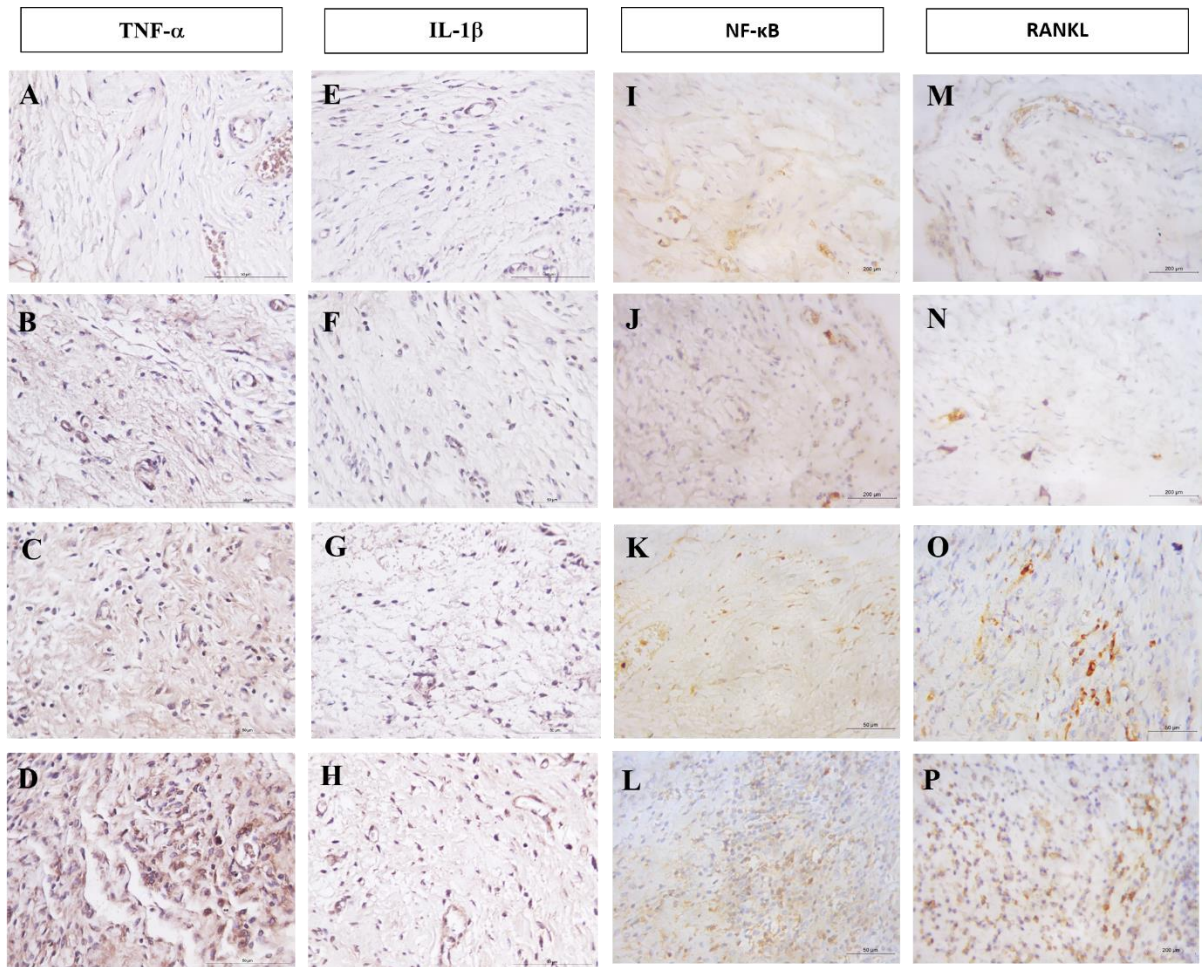




**Fig. 2.**



**Fig. 3.**



**Fig. 4.**

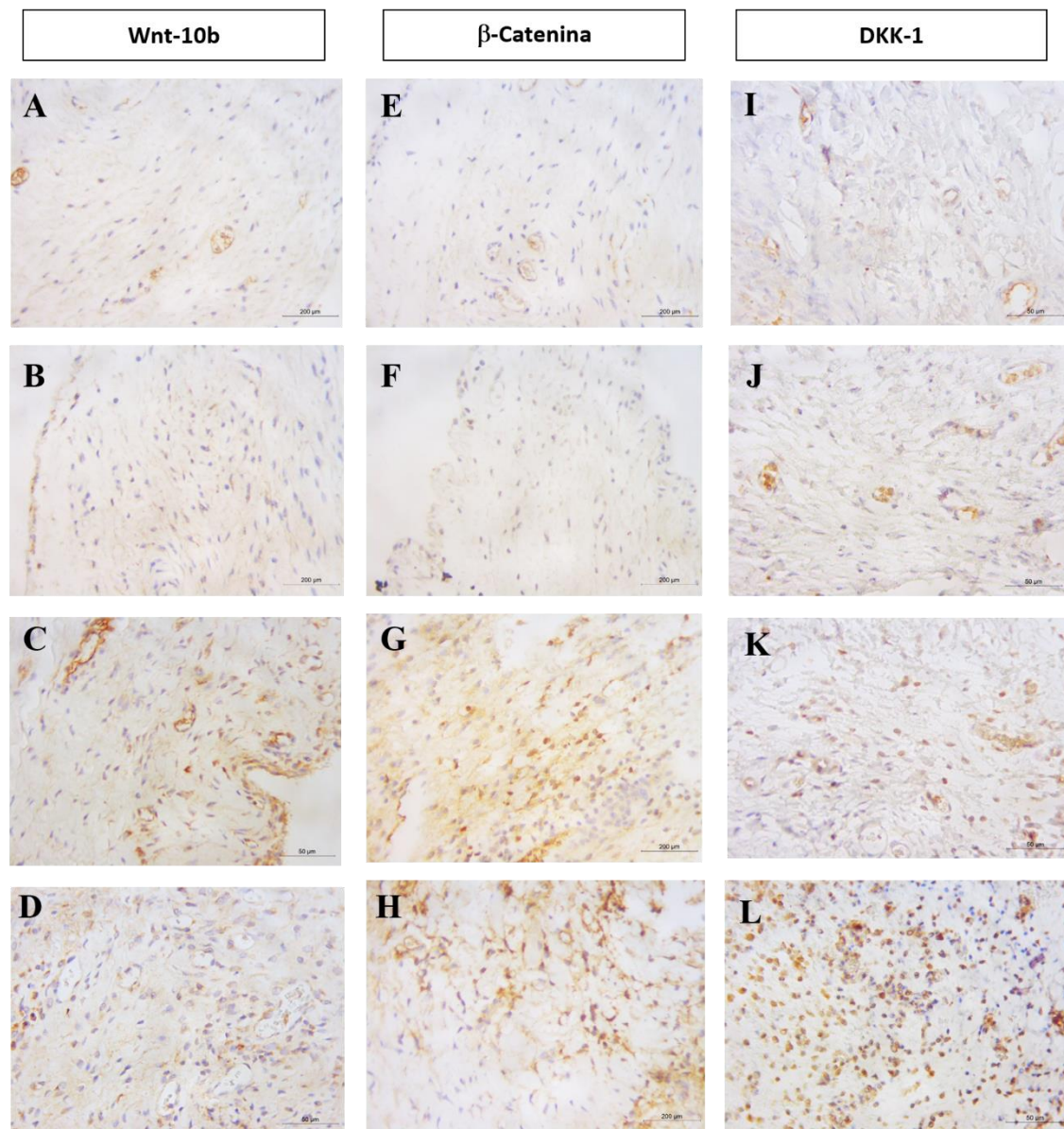
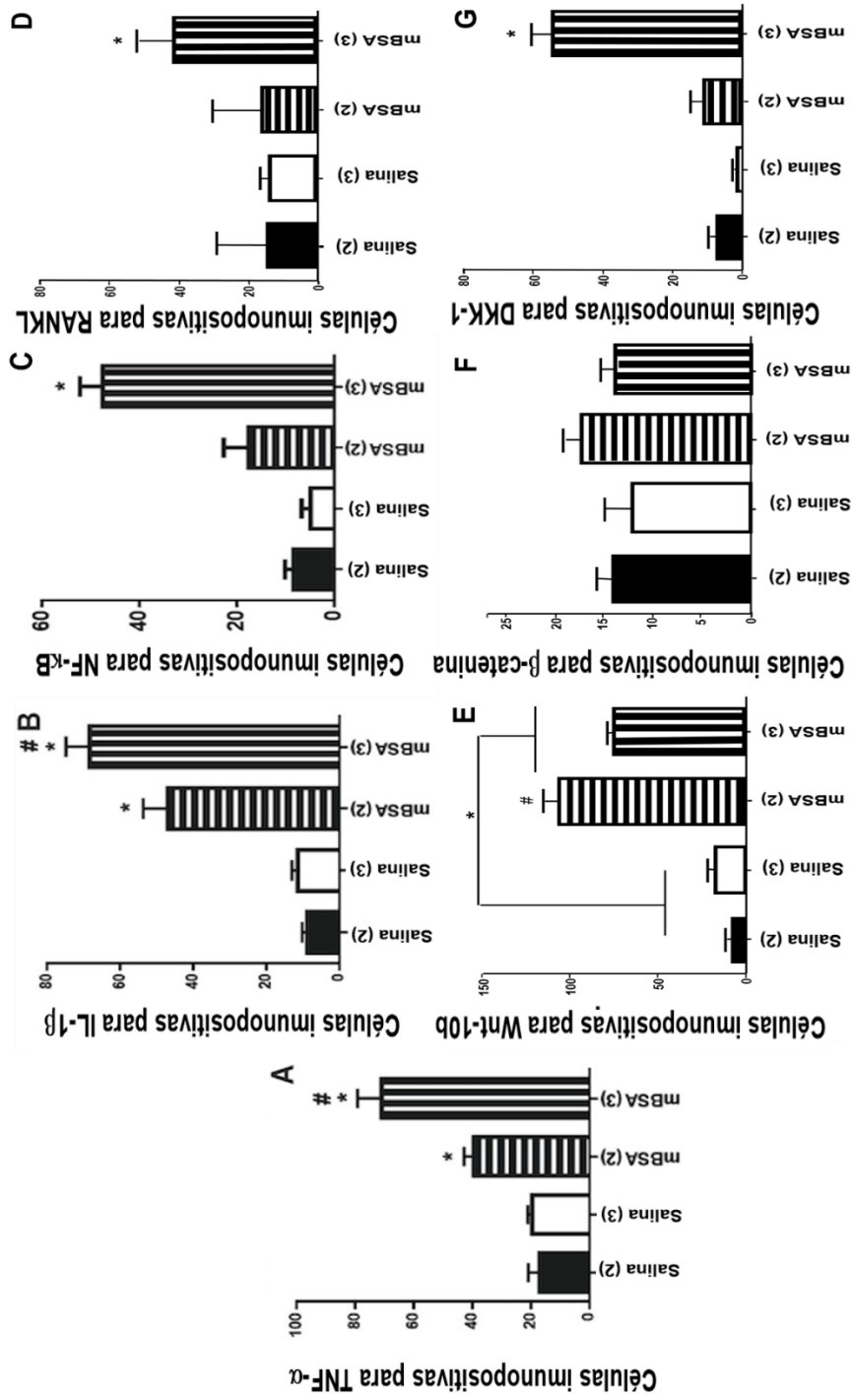


Fig. 5.



## LEGENDAS

**Fig 1.** Avaliação da nocicepção na ATM na AR crônica induzida por mBSA. (A) Fase de sensibilização e (B) Fase de Desafio. Pontos representando medias±DPM de 6 animais por grupo. \*Diferença estatística comparada ao grupo controle no dia 20. #Diferença estatística comparada ao mesmo grupo no dia ( $p<0.0001$ ; Two- way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

**Fig 2.** Fotomicrografias da membrana sinovial da ATM dos grupos experimentais. Membrana sinovial normal (A). Membrana sinovial grupo salina (1) (B). Membrana sinovial grupo salina (2) (C). Membrana sinovial grupo salina (3) (D). Membrana sinovial grupo mBSA (1) (E). Membrana sinovial do grupo mBSA (2) (F). Membrana sinovial do grupo mBSA (3) (G). Hematoxilina & eosina (H&E).

**Fig 3.** Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B e RANKL após injeções de reforço de mBSA na ATM. Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para TNF- $\alpha$  nos grupos Salina (2) (A), Salina (3) (B), mBSA (2) (C) e mBSA (3) (D). Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para IL-1 $\beta$  dos grupos Salina (2) (E), Salina (3) (F), mBSA (2) (G) e mBSA (3) (H). Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para NF- $\kappa$ B dos grupos Salina (2) (I), Salina (3) (J), mBSA (2) (K) e mBSA (3) (L). Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para RANKL dos grupos Salina (2) (M), Salina (3) (N), mBSA (2) (O) e mBSA (3) (P).

**Fig. 4.** Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para Wnt-10b,  $\beta$ -catenina e DKK-1. Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para Wnt-10b dos grupos Salina (2) (A), Salina (3) (B), mBSA (2) (C) e mBSA (3) (D). Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para  $\beta$ -catenin dos grupos Salina (2) (E), Salina (3) (F), mBSA (2) (G) e mBSA (3) (H). Fotomicrografias da imunomarcção positiva de células na membrana sinovial para DKK-1 dos grupos Salina (2) (I), Salina (3) (J), mBSA (2) (K) e mBSA (3) (L).

**Fig. 5.** Análise quantitativa de células imunocoradas em membrana sinovial para

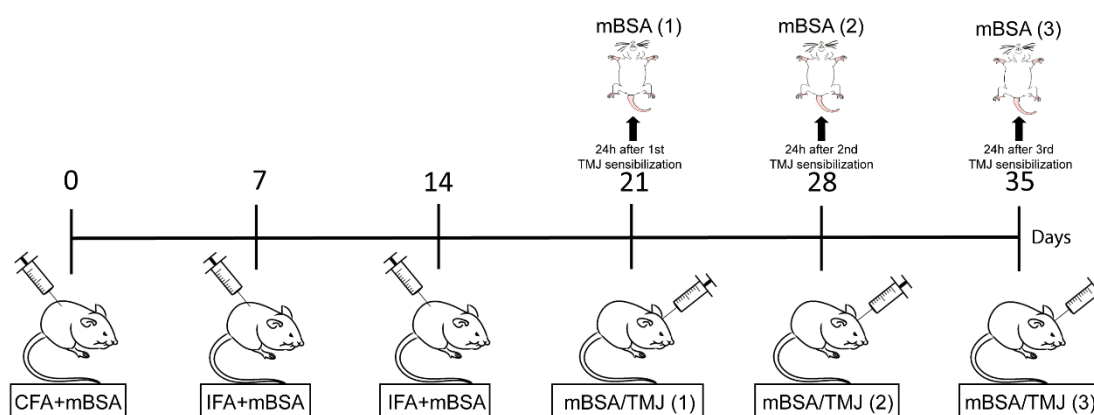
TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, RANKL, Wnt-10b,  $\beta$ -catenina e DKK-1, após injeções de reforço de mBSA na ATM. Os ratos tratados com salina (ATM direita) ou 2 ou 3 injeções de mBSA (ATM esquerda). Contagem de células imunopositivas para TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), NF- $\kappa$ B (C), RANKL (D), Wnt-10b (E),  $\beta$ -catenina (F) e DKK-1 (G) em membrana sinovial foi realizada. Resultados são expressos como médias $\pm$  DPM de, no mínimo, 6 animais por grupo. #  $p < 0.05$  mBSA (2) versus grupo salina, \*  $p < 0.05$  mBSA (3) versus outros grupos (One-way ANOVA e teste de Tukey).

### TABELAS

Grupos	Espessamento da membrana sinovial	Infiltrado inflamatório da membrana sinovial
Controle	0 (0-0)	0 (0-0)
Salina (1)	0 (0-0)	0 (0-0)
Salina (2)	0 (0-0)	0 (0-0)
Salina (3)	0 (0-1)	0 (0-1)
mBSA (1)	0 (0-1)	0 (0-2)
mBSA (2)	1 (1-3)	1 (1-3)
mBSA (3)	3 (2-3)*	3 (2-3)*

Table 1. Análise histopatológica da membrana sinovial. \*Representa diferença significativa entre o grupo mBSA (3) e os demais. (\*  $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis e teste de Dunn).

### ARQUIVO SUPLEMENTAR



**Material suplementar: Modelo de protocolo experimental.** Indução da AR induzida por mBSA na ATM de ratos. mBSA = albumina de soro bovina metilada; CFA =

Adjuvante Completo de Freund; IFA = Adjuvante Incompleto de Freund; ATM = Articulação Temporomandibular.

### **DESTAQUES**

- As vias de sinalização Wnt canônica e NF-kB participam das alterações morfológicas da Artrite Reumatoide na articulação temporomandibular de ratos.
- A imunexpressão de Wnt-10b e DKK1 pode estar associada a inflamação e hiperplasia da membrana sinovial na ATM na AR.
- A via NF-kB contribui para inflamação sinovial na artrite reumatoide.

**ANEXO A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da  
Universidade Federal do Ceará**



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “Alterações morfológicas da articulação temporomandibular em modelo experimental de artrite reumatóide em ratos”, protocolo nº 35/15, sob responsabilidade Emmanuel Prata de Souza, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 20 de maio de 2015.

Vigência do projeto	21/02/2015 a 21/02/2017
Espécie/Linhagem	Rato Wistar heterogênico
Nº de Animais	60
Peso/Idade	180 g / ~2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 01 de junho de 2015

Rodrigo Siqueira  
Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734